



TITLE:

Generation of non-viral, transgene-free hepatocyte like cells with piggyBac transposon.(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Katayama, Hokahiro

CITATION:

Katayama, Hokahiro. Generation of non-viral, transgene-free hepatocyte like cells with piggyBac transposon.. 京都大学, 2017, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2017-07-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20605>

RIGHT:

許諾条件により本文は2018-01-01に公開; Hokahiro Katayama, Kentaro Yasuchika, Yuya Miyauchi, Hidenobu Kojima, Ryoya Yamaoka, Takayuki Kawai, Elena Yukie Yoshitoshi, Satoshi Ogiso, Sadahiko Kita, Katsutaro Yasuda, Naoya Sasaki, Ken Fukumitsu, Junji Komori, Takamichi Ishii & Shinji Uemoto. "Generation of non-viral, transgene-free hepatocyte like cells with piggyBac transposon". Scientific Reports 7, Article number: 44498 (2017), doi:10.1038/srep44498

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	片山 外大
論文題目	Generation of non-viral, transgene-free hepatocyte like cells with <i>piggyBac</i> transposon. （非ウィルスベクターである piggyBac transposon を用いた挿入遺伝子の遺残のない肝細胞様細胞の作製）		
（論文内容の要旨）			
<p>【背景】direct reprogramming による肝細胞様細胞(iHeps)の作製において、強制発現すべきマスター因子を導入する際には適切なベクターの選択が重要である。ウィルスベクターはreprogramming においてよく用いられるベクターであるが、レトロウィルスやレンチウィルスのような組込み型ウィルスベクターは遺伝子の挿入に伴い染色体の変異を起こすリスクや遺伝子毒性などを有し、一方でアデノウィルスのような非組込み型ウィルスベクターでは遺伝子の強制発現は一時的であり reprogramming 効率が低い、などの問題点が指摘されている。ウィルスベクター自体が取り扱いに注意が必要であることを考慮すると、iHeps を臨床応用する際には非ウィルスベクターを使用することが望ましいと考えられる。transposon の一種である piggyBac は遺伝子挿入効率が高く運搬可能な塩基数が大きいといった長所に加え、切り出された後には挿入されていた痕跡が残らないという特長を有する。そこで本研究では piggyBac ベクターを用いたdirect reprogrammingにより iHeps を作製し、さらに挿入した遺伝子を除去することにより挿入遺伝子の遺残に伴うリスクが低減された iHeps を作製することを試みた。</p> <p>【方法・結果】transposon 領域内に dual promoter を含有している piggyBac ベクターにおいて、上流の promoter 下に 2A 配列でつないだ Foxa3 と Hnf4a を、下流の promoter 下に mRuby を組み込んだマスター因子発現ベクターを作製し、transposase 発現ベクターと同時にマウス間葉系幹細胞へトランスフェクションした。薬剤選択後に分化用培地を用いて分化誘導を開始したところ、遺伝子が挿入され赤い蛍光を有する細胞では肝特異的な遺伝子の発現や albumin や E-cadherin、Cyp1A2 などのタンパクの産生、またグリコーゲン顆粒や脂肪滴の貯蓄、ICG の取り込み、尿素産生などの肝細胞機能が確認され、iHeps が作製されたことが確認された。次いでこの iHeps に transposase 発現ベクターのみをトランスフェクションし、赤色蛍光を失った細胞のみを flow cytometry により回収した上でスフェロイド形成させた。作製されたスフェロイド iHeps は挿入遺伝子が除去されていることがPCRにより確認された。この挿入遺伝子の遺残のない iHeps においても挿入遺伝子除去操作前の iHeps と同様に肝細胞機能は維持されていることが確認された。さらに肝特異的遺伝子の発現や albumin 産生能において、少なくともスフェロイド形成 12 日後においても同レベルで維持されていることが確認された。</p> <p>【結語】piggyBac ベクターを用いて挿入遺伝子の遺残のない iHeps を作製することが可能であった。この手法はウィルスベクターの使用や遺伝子挿入に伴うリスクを低減する長所を有するため、臨床応用に適用し得る iHeps を作製する今後の研究の進展に寄与すると考えられる。</p>			

（論文審査の結果の要旨） direct reprogramming により肝細胞様細胞(iHeps)を作製する研究においては組込型ウィルスベクターがよく用いられるが、今後の臨床応用に向けては非ウィルスベクターの利用が望ましいと考えられる。学位申請者は非ウィルスベクターである piggyBac transposon ベクターを用いて挿入遺伝子の遺残のない iHeps を作製することを目的として研究を行った。 reprogramming 因子として Hnf4a と Foxa3 を選択し、マーカー遺伝子を mRuby として transgene を piggyBac ベクターに組み込んだ発現ベクターを作製した。マウス間葉系幹細胞へこの transgene を導入し、分化誘導したところ肝特異的な遺伝子の発現や肝細胞機能が認められ、iHeps が作製されたことが確認された。 次いで作製された iHeps から transgene を除去した後に flow cytometry にて回収し、スフェロイド形成させた細胞 (TFSiHeps) も 12 日間の培養期間を通じて肝特異的な遺伝子の発現や肝細胞機能が維持された。 以上の研究はウィルスを用いず、また遺伝子の遺残のない肝細胞様細胞を作製することが可能なことを示したものであり、将来的な細胞移植治療や人工肝作製などの再生医療に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 5 月 10 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
要旨公開可能日： 年 月 日 以降